2010年３月　第３版

研究用試薬

モリナガ FASPEK

卵ウエスタンブロットキット
（卵白アルブミン）

取扱説明書

【お願い】
製品をご使用になる前に、
必ずお読み下さい。

株式会社森永生科学研究所
横浜市金沢区幸浦2-1-16　〒236-0003
http://www.miobs.com

■ キットの構成

	品　名	容 量	数量
A	抽出用Ａ液（20 倍濃縮液）	55mL	１本
B	抽出用Ｂ液（20 倍濃縮液） 医薬用外毒物　2-ﾒﾙｶﾌﾟﾄｴﾀﾉｰﾙ 40%含有	55mL	１本
C	検体希釈液（20 倍濃縮液）	50mL	１本
D	卵標準品（10μg/mL） 医薬用外毒物　2-ﾒﾙｶﾌﾟﾄｴﾀﾉｰﾙ 4%含有	500μL	１本
E	ウサギ抗卵白アルブミン抗体溶液	1.2mL	１本

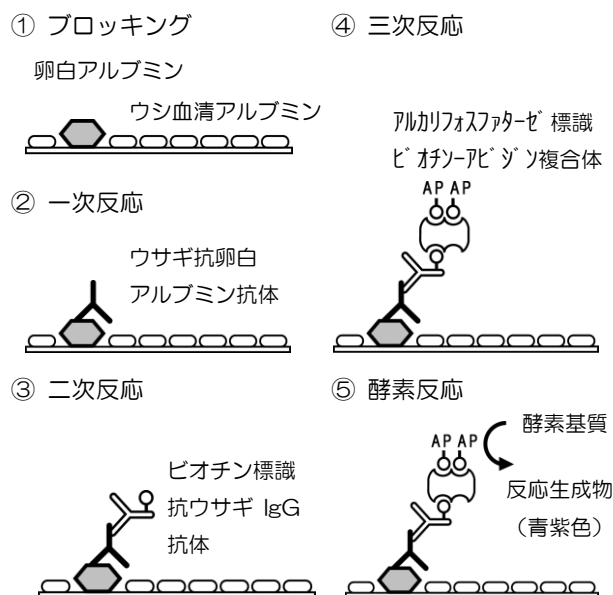
■ キットの特長

1．本キットは、通知（「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」平成14年11月６日付け食発第1106001号厚生労働省医薬局食品保健部長通知）に記載された定量検査法によって得られた検査結果の確認検査として用いる卵タンパク質検出用ウエスタンブロットキットです。
2．本キットの抽出液はモリナガ FASPEK 特定原材料測定キットの抽出液と同一の組成です。
3．本キットは、食品検体中に含まれる卵タンパク質を、卵白アルブミンを指標として検出します。

■ 測定する際の注意事項

1．キットの試薬にはアレルゲン性を有する卵タンパク質やウシ血清アルブミンを使用しています。これらのタンパク質にアレルギーのある方は試薬の取扱いに十分に注意し、慎重に測定操作を行って下さい。
2．試薬は全て室温（20～25℃）に戻してから使用して下さい。
3．本キットによる測定は埃などが除去された清潔な環境で行って下さい。口や手からの混入を防ぐため、実験中はマスクや使い捨てのプラスチック手袋等を着用することをお勧めします。
4．本キットは高濃度の2-メルカプトエタノールを含むため、ご使用の際特有の臭気を感じることがあります。そのため、検体の抽出・調製の際にはドラフトの使用をお勧めします。
5．2-メルカプトエタノールは毒物ですので、法令に則った取り扱いをして下さい。

■ 測定原理

1．ポリアクリルアミドゲル電気泳動
サンプル中のタンパク質を、その分子量に従って分離する。
2．ブロッティング
ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離したタンパク質を電気的に転写膜へ転写する。
3．免疫染色
① 〈ブロッキング〉
ウサギ抗卵白アルブミン抗体が非特異的に転写膜に結合するのを防ぐため、ウシ血清アルブミンで転写膜をブロッキングする。
② 〈一次反応〉
ウサギ抗卵白アルブミン抗体が、転写膜上の卵白アルブミンに結合し、[ウサギ抗卵白アルブミン抗体/卵白アルブミン] の複合体を形成する。
③ 〈二次反応〉
ビオチン標識抗ウサギIgG抗体が複合体中のウサギ抗卵白アルブミン抗体と結合する。
④ 〈三次反応〉
アルカリホスファターゼ標識ビオチン-アビジン複合体がビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体と結合する。
⑤ 〈酵素反応〉
検出試薬を添加すると、転写膜上の複合体に結合したアルカリホスファターゼにより試薬中の基質が呈色し、膜上に青紫色のバンドとして沈着する。

■ その他必要な器具・装置・試薬

本キットを用いてウエスタンブロット法を実施するには、下記に示した器具、装置、試薬または同等品が別途必要です。（下記は当社での使用例です）

サンプル調製

・ホモジナイザー
　ミルサー IFN-700G　［岩谷産業(株)］
・ローディング緩衝液
　Laemmli Sample Buffer　[BIO-RAD]※1
　2-メルカプトエタノール
・ヒートブロックまたは湯浴
・振とう機

電気泳動

・電源装置
　Electrophoresis Power Supply - EPS 1001 [GE]※2
・泳動装置
　セイフティーセルミニ　STC-808　［テフコ（株）］
・分子量スタンダード
　SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard[Invitrogen]※3
・ポリアクリルアミドゲル
　Q-PAGE mini 12.5%1.0mm×12well　［テフコ(株)］
・泳動用緩衝液
　Tris-BES 泳動バッファー（10x）　［テフコ（株）］
・酸化防止剤
　酸化防止剤（400x）　［テフコ（株）］

ブロッティング

・転写装置
　トランスブロット SD セル　[BIO-RAD]※1
・転写膜
　Hybond-P（PVDF メンブレン）　[GE]※2
・ろ紙
　ブロットアブソーベントフィルターペーパー（極厚）　[BIO-RAD]※1
・転写用緩衝液
　10x Tris/Glycine　[BIO-RAD]※1
　メタノール

免疫染色

・洗浄液
　10x TBS　[BIO-RAD]※1
　Tween-20
・ブロッキング試薬
　ウシ血清アルブミン
・二次抗体キット
　VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit　[VECTOR]※4
・検出試薬
　Alkaline Phosphatase Substrate Kit Ⅳ <BCIP/NBT>　[VECTOR]※4
・検出試薬用緩衝液
　100 mM　Tris/塩酸（pH 9.5）

※1　バイオ・ラッド　ラボラトリーズ（株）
※2　GE ヘルスケア・ジャパン（株）
※3　ライフテクノロジーズジャパン（株）インビトロジェン製品
※4　VECTOR LABORATORIES, Inc.

■ 試薬の調製

試薬はすべて常温に戻してから使用して下さい。試薬の必要量は用いる容器によって異なります。必要量を確認の上、調製して下さい。

1．ローディング緩衝液の調製
　Laemmli Sample Buffer と 2-メルカプトエタノールを 19：1 で混和したものを用います。

2．検体抽出液の調製
　A 抽出用Ａ液、B 抽出用Ｂ液、C 検体希釈液、精製水を 1:1:1:17 の比率で混合します。
　＊ A 抽出用Ａ液に沈澱が生じている場合は加温溶解してからご使用下さい。溶解後は室温で保存可能です。

3．泳動用緩衝液の調製
　Tris-BES 泳動バッファー(10x)を精製水で 10 倍に希釈して使用します。上部バッファー槽に酸化防止剤(400x)を 400 倍希釈になるように添加して下さい。

4．転写用緩衝液の調製
　精製水とメタノールおよび 10x Tris/Glycine を７:２:１の比で混和して使用します。

5．洗浄液の調製
　10x TBS を精製水で 10 倍に希釈します。この溶液に Tween-20 を終濃度が 0.05%になるように添加して下さい。
　＊ ブロッキング溶液の調製に使用します。

6．ブロッキング溶液の調製
　調製済み洗浄液にウシ由来血清アルブミンを終濃度が 0.1%になるように添加して下さい。
　＊ 免疫染色に用いる各試薬の調製に使用します。

7．一次抗体溶液の調製
　E ウサギ抗卵白アルブミン抗体溶液を調製済みブロッキング溶液で 100 倍に希釈します。

8．二次抗体溶液の調製
　VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit のビオチン標識抗ウサギIgG抗体をブロッキング溶液で 10,000 倍に希釈します。

9．アルカリホスファターゼ標識ビオチン-アビジン溶液の調製
　VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit 中の A 液と B 液をブロッキング溶液 10 mL に対して、それぞれ１滴の割合で順次混和します。
　＊ 当溶液は使用する 30 分前に調製して下さい。

１０．検出試薬の調製
　Alkaline Phosphatase Substrate Kit Ⅳ <BCIP/NBT> 中の１液、２液、３液を 100 mM Tris/塩酸（pH 9.5）10 mL に対して、それぞれ２滴の割合で順次混和します。

■ 操作手順

Ⅰ．検体および標準品の調製

1．検体の抽出・調製

⑴ 食品検体をミキサー等で粉砕し、均質化操作を行います。
均質化された検体１ｇをポリプロピレン製 50 mL 遠心管等に取り、検体抽出液 19 mL を加えてよく振り混ぜて混合します。この際にあまり泡立たせないよう注意しながら、ボルテックスミキサー等を用いて検体を分散させます。

⑵ 遠心管を横にして振とう機で一晩（12 時間以上）振とうしながら抽出します（90～110 往復/分、室温、振とう幅３cm 程度）。振とうにより、液が遠心管の両端に打ち付けるように調整します。時々遠心管の上下を入れ替える等をして、液面に沿って付着する検体を分散させます。

⑶ 抽出液の pH を確認し、必要であれば中性付近（pH 6.0～8.0）になるように調整します。（pH 試験紙で結構です）

⑷ 3,000×g で 20 分間(室温)遠心分離し、上清を分取します。沈査が得られない場合は上清をろ紙でろ過し、抽出液とします。

⑸ この抽出液とローディング緩衝液を1:２で混和し、沸騰水浴中で５分間加温したものを泳動用サンプルとします。

2．卵標準品の調製

⑴ 検体抽出液とローディング緩衝液を1:２で混和し、沸騰水浴中で５分間加温して標準品の希釈液を作製します。

⑵ D 卵標準品（10μg/mL）を終濃度が１μg/mL および0.5μg/mLになるように⑴で作製した希釈液にて調製して下さい。

Ⅱ．ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ご使用になる装置・試薬の取扱説明書に従い実施して下さい。

1．ポリアクリルアミドゲルを電気泳動槽にセットし、ゲルの各ウェルが完全に浸るまで泳動用緩衝液を注ぎます。液漏れのないことを確認して下さい。

2．ゲルのウェルに分子量スタンダードを７μL、卵標準品（10μg/mL、1μg/mL、0.5μg/mL）および泳動用サンプルを 20μL ずつ注入します。
＊ 注入の際に試料が隣のウェルに混入しないよう注意して下さい。

3．ゲル１枚あたり 60 mA の定電流で泳動します。ローディング緩衝液に含まれるブロモフェノールブルーがゲルの下端から１cm のあたりまで進んだところで泳動を終了します。

Ⅲ．ブロッティング

ご使用になる装置・試薬の取扱説明書に従い実施して下さい。以下の説明は本体が陽極、蓋が陰極の装置に基づいています。

1．転写膜、ろ紙２枚とゲルを、転写装置の陽極面からろ紙、転写膜、ゲル、ろ紙の順に重層します。
＊ ろ紙は予め 30 分間転写用緩衝液に浸しておきます。また、転写膜はメタノールに数十秒間浸してから転写用緩衝液に 30 分間浸して使用します。
＊ 転写膜、ゲル等を重層する際に気泡が入らないよう注意して下さい。
＊ ゲルの乾燥を防ぐために、作業は速やかに行って下さい。

2．陰極のついた上部蓋を閉じ、15 V の定電圧で１時間転写します。

Ⅳ．免疫染色

1．転写後の膜を速やかにブロッキング溶液に浸し、室温で１時間振とう又は 4℃で一晩静置します。

2．ブロッキング溶液を捨て、膜を一次抗体溶液に浸して１時間振とうします。

3．一次抗体溶液を捨て適量の洗浄液を加え、５分間振とうします。この洗浄操作を３回繰り返します。

4．洗浄液を捨て、膜を二次抗体溶液に浸して 30 分間振とうします。反応後、溶液を捨て洗浄液で５分間３回洗浄します。

5．膜をアルカリホスファターゼ標識ビオチン-アビジン溶液に浸し、20 分間振とうします。反応後、溶液を捨て洗浄液で５分間３回洗浄します。

6．膜を 100 mM Tris/塩酸（pH 9.5）に浸し、15 分間振とうします。

7．溶液を捨て検出試薬に３～10 分間浸し、目的タンパク質のバンドを検出します。バックグラウンドが高くならないよう注意して下さい。

8．バンドが十分濃くなったら検出試薬を取り除き、精製水で膜をすすいだ後に遮光しながら精製水中で１５分間振とうして洗浄します。

9．洗浄操作の終わった膜は風乾して下さい。遮光下で保存可能です。

■ 結果の判定

ポリアクリルアミドゲル電気泳動における卵白アルブミンの見かけ上の分子量（MW= 50,000）付近に明瞭なバンドが検出されたものを陽性とします。

■ バリデーション試験結果

試　料

ジュース、ゼリー、おしるこ、トマトソース、コンソメスープ

各試料に卵一次標準品粉末をタンパク質濃度が 0μg/g 又は 10μg/g となるように添加した。

参加機関（8 機関）

カゴメ株式会社
神奈川県衛生研究所
川崎市衛生研究所
埼玉県衛生研究所
千葉県衛生研究所
社団法人日本食品衛生協会 食品衛生研究所
株式会社ハウス食品分析テクノサービス
株式会社ファスマック　(50 音順)

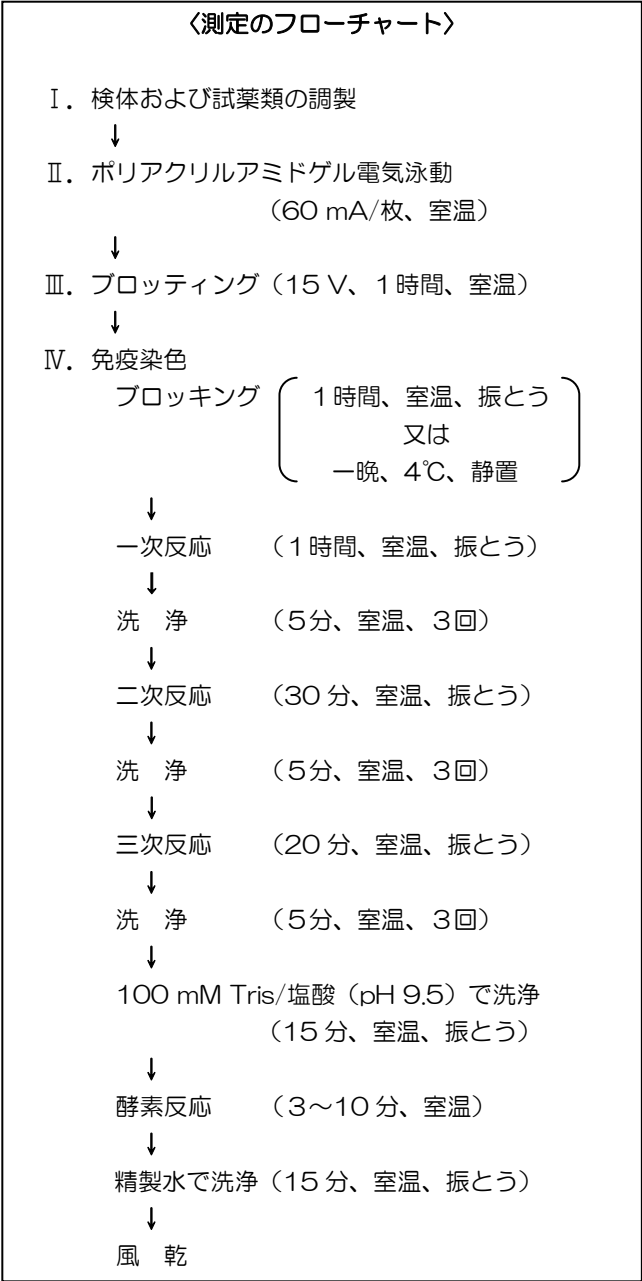
手　順

測定マニュアル、報告様式に関する文書、試料（10 種類）、キット、その他必要試薬をそれぞれの参加機関に送付した。参加機関は各試料毎に２回の抽出・測定を行い、得られた結果を株式会社森永生科学研究所へ返送した。

バリデーション結果

下表に、本キットのバリデーションから得られた結果を示す。卵濃度 0μg/g のブランク試料では全ての試料で陰性であり、10μg/g の卵を含む試料では全ての試料で陽性となった。以上より、ブランク試料の陰性率、10μg/g 添加試料における陽性率は 90%以上であり、通知（「アレルギー物質を含む食品の検査法について」平成 14 年 11 月 6 日付け食発第 1106001 号厚生労働省医薬局食品保健部長通知）の基準を満たしている。

（表）モリナガ FASPEK 卵ウエスタンブロットキット
（卵白アルブミン）

試　料	陽性率 添加卵濃度 （0μg/g）	 添加卵濃度 （10μg/g）
ジュース	0/16	16/16
ゼリー	0/16	16/16
おしるこ	0/16	16/16
トマトソース	0/16	16/16
コンソメスープ	0/16	16/16

■ 使用上又は取扱い上の注意

1. 本キット内の試薬は、研究目的以外に使用しないで下さい。
2. 有効期限の過ぎたキットは使用しないで下さい。
3. 保存中や反応中は強い光にさらさないで下さい。

■ キットの保存条件および有効期限

1. 2～8℃で光の当たらない場所に保管して下さい。
2. 有効期限はキット外箱のラベルに記載してあります。

■ 保　証

1. 本キットを使用して得られた結果の評価および利用は、お客様の責任と判断において行って下さい。
2. 測定結果を利用した結果として発生した損害および損失については、当社は一切責任を負いません。
3. 本キット以外の試薬または原材料を使用して得られた結果については、当社は一切保証いたしません。
4. 万一、製品に品質上の瑕疵があると当社が判断した場合は、新しい製品とお取り替えいたします。